

Hit List

First Hit

Search Results - Record(s) 1 through 2 of 2 returned.

☐ 1. Document ID: JP 10087509 A

L2: Entry 1 of 2

File: JPAB

Apr 7, 1998

PUB-NO: JP410087509A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 10087509 A

TITLE: TUMOR METASTASIS INHIBITOR

PUBN-DATE: April 7, 1998

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
KANAI, TOSHIKAZU	
KONNO, HIROYUKI	
TANAKA, TATSURO	
BABA, SHOZO	
ASANO, MAKOTO	
SUZUKI, HIDEO	

INT-CL (IPC): A61K 39/395; A61K 39/395; A61K 45/00; C12N 15/02; C07K 7/06; C07K 7/08; C07K 14/47; C12P 21/08

ABSTRACT:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject agent little in side effects, consisting of a vascular endothelial cell growth factor inhibitor, and enabling tumor growth and metastasis to be inhibited through suppressing the vascularization promotive activity of vascular endothelial cell growth factor/vascular permeability factor.

SOLUTION: This tumor metastasis inhibitor consists of a vascular endothelial cell growth factor (VEGF) inhibitor which is pref. an anti-VEGF monoclonal antibody reactive to each sequence of formula I, II or III, part of the amino acid sequence of VEGF/VPF(vascular permeability factor). The monoclonal antibody is obtained, for example, by the following process: human VEGF is purified from a yeast culture solution subjected to transformation with the cDNA of VEGF and a conjugate composed of the human VEGF and keyhole limpet hemocyanin(KLH) is prepared, and the splenocyte of a mouse immunized with the KLH-VEGF conjugate is then fused with mouse myeloma cell followed by the aimed production by the resultant hybridoma. The effective daily does of the monoclonal antibody is 0.1-100mg/Kg body weight for parenteral administration.

COPYRIGHT: (C) 1998, JPO

Full	Title	Citation	Front	Review	Classification	Date	Reference	Sequence	Documents	Claims	Keyword	Draw Desc	Clip Img	Ima
------	-------	----------	-------	--------	----------------	------	-----------	----------	-----------	--------	---------	-----------	----------	-----

☐ 2. Document ID: JP 10087509 A

L2: Entry 2 of 2

File: DWPI

Apr 7, 1998

DERWENT-ACC-NO: 1998-267032

DERWENT-WEEK: 199824

COPYRIGHT 2007 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Tumour metastasis inhibitor - consists of vascular endothelial cell growth factor inhibitor

PRIORITY-DATA: 1996JP-0202765 (July 15, 1996)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
JP 10087509 A	April 7, 1998		010	A61K039/395

INT-CL (IPC): A61K 39/395; A61K 45/00; C07K 7/06; C07K 7/08; C07K 14/47; C12N 15/02; C12P 21/08

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 10087509A

BASIC-ABSTRACT:

A tumour metastasis inhibitor consisting of vascular endothelial cell growth factor inhibitor is new.

In an example, anti-vascular endothelial cell growth factor polyclonal antibody was produced, an antibody-producing cell was prepared. A myeloma cell was prepared and cell fusion was carried out. The hybridoma was selected and cultured. The monoclonal antibody was collected and purified. The reaction site of the monoclonal antibody was identified. A peptide corresponding to part of the amino acid sequence of vascular endothelial cell growth factor was prepared. A peptide reacting with the monoclonal antibody was identified. The monoclonal antibody was used as a tumour metastasis inhibitor.

ADVANTAGE - The drug can be effectively applied in metastasis therapy.

Full	Title	Citation	Front	Review	Classification	Date	Reference	Sequences	Attachments	Claims	KWC	Draw Desc	Image
------	-------	----------	-------	--------	----------------	------	-----------	-----------	-------------	--------	-----	-----------	-------

Clear	Generate Collection	Print	Fwd Refs	Bkwd Refs	Generate OACS
-------	---------------------	-------	----------	-----------	---------------

Term	Documents
JP-10087509-\$	0
JP-10087509-A	2
JP-10087509-\$.DID. .JPAB,DWPI.	2
(JP-10087509-\$.DID.) .JPAB,DWPI.	2

Display Format:

[Previous Page](#)

[Next Page](#)

[Go to Doc#](#)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-87509

(43) 公開日 平成10年(1998) 4月7日

(51) Int.Cl.⁶

A 6 1 K 39/395

識別記号

ADU

F I

A 6 1 K 39/395

ADUD

N

45/00

C 1 2 N 15/02

45/00

C 0 7 K 7/06

Z N A

// C 0 7 K 7/06

Z N A

7/08

審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平9-181769

(22) 出願日

平成9年(1997) 6月23日

(31) 優先権主張番号

特願平8-202765

(32) 優先日

平8(1996) 7月15日

(33) 優先権主張国

日本 (J P)

(71) 出願人 000003034

東亜合成株式会社

東京都港区西新橋1丁目14番1号

(72) 発明者 金井 俊和

静岡県浜松市葵東2-9-32 U-エミネ
ンス106

(72) 発明者 今野 弘之

静岡県浜松市和合町308-46

(72) 発明者 田中 達郎

静岡県浜松市住吉2-33-14 ガーテン
シティ住吉303

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍転移抑制剤

(57) 【要約】

【課題】 腫瘍細胞の転移を抑える副作用の少ない腫瘍
転移抑制剤を提供することを目的とする。

【解決手段】 血管内皮細胞増殖因子阻害剤を有効成分
とする。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 血管内皮細胞増殖因子阻害剤からなる腫瘍転移抑制剤。

【請求項2】 血管内皮細胞増殖因子阻害剤が抗血管内皮細胞増殖因子抗体であることを特徴とする請求項1記載の腫瘍転移抑制剤。

【請求項3】 抗血管内皮細胞増殖因子抗体が抗血管内皮細胞増殖因子／血管透過性因子抗体であることを特徴とする請求項2記載の腫瘍転移抑制剤。

【請求項4】 抗血管内皮細胞増殖因子／血管透過性因子抗体が当該因子のアミノ酸配列の一部である下記配列と反応する抗体であることを特徴とする請求項3記載の腫瘍転移抑制剤。

1. KPSCVPLMR

2. SFLQHNKCECRP

3. KCECRPKKDRAR

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、腫瘍細胞の転移を抑える副作用の少ない腫瘍転移抑制剤に関するものであり、医療、製薬技術に属するものである。

【0002】

【従来の技術】腫瘍の治療法として現在広く用いられているものの多くは、化学療法であれ、放射線療法であれ腫瘍細胞そのものをターゲットとしたものがほとんどである。薬剤の投与による腫瘍に対する選択的攻撃は、腫瘍細胞が他の正常な細胞に比べてはるかに活発に分裂、増殖を繰り返しているという性状に依るところが大きい。すなわち細胞の増殖機構そのものを破壊、ないしは阻害することによって標的細胞を殺すという目的を達成するものである。

【0003】一方、固形腫瘍の増殖を抑制する方法に、その栄養ならびに酸素の供給源を断つ、いわゆる兵糧攻めのアイデアが提唱されてきた。すなわち腫瘍細胞そのものを攻撃することなく、栄養や酸素を枯渇状態におとしめ、結果として腫瘍の増殖抑制、そして退縮という治療効果をあげるというものである。この手法の具体的な標的として、腫瘍に到達している血管があげられている。

【0004】すなわち一般に細胞が悪性転化し癌細胞が発生したとしても、その増殖は初期においては非常にゆっくりしたものであると言われており、発生した腫瘍は血管の到達無しには直径2mm以上には増殖しないとさえ言われている(M. A. Gimbrone et al., J. Exp. Med. 136, 261, 1972)。ところがこの病変部位にひとたび血管が到達すると、その血管を通して供給される無尽蔵な栄養と酸素により、腫瘍は爆発的に増殖を開始するのみならず、その血管を介して遠隔転移なども起こすことになり、血管新生が腫瘍の進行、転移と切っても切れない関係にあると言われていたのである。

2

【0005】一方、血管の新生を誘起する、或いは血管の構成細胞である血管内皮細胞の増殖を促進させる物質として、aFGF、bFGF、EGF、PD-ECGF、VEGF(血管透過性因子：VPFとも略称されている)、TGF- β 、Angiogenin等多くの物質が報告されている(R. Bicknell and A. L. Harris, Eur. J. Cancer 27, 6, 781, 1991)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明者等は、癌細胞に血管の新生、遊走を誘起する因子を見出し、その機能を阻害し、腫瘍の増殖を抑えさらには腫瘍の転移を抑えることによって、従来の腫瘍そのものをターゲットとした癌の治療方法とは異なる、新規かつ有効な癌の治療方法及び予防方法が提供できるのでないかと考え、鋭意検討を行ったのである。

【0007】

【課題を解決する手段】本発明者等は、前記した血管の新生を誘起する、あるいは血管の構成細胞である血管内皮細胞の増殖を促進させる物質のどの物質が、どのような機作で前述の癌血管新生因子(TAF)の作用を担っているのか半明していないなかで、特に前記因子のうちで血管内皮細胞増殖因子／血管透過性因子が細胞外分泌に係わるシグナルペプチドを有すること、ならびに様々な癌細胞で発現が見られることに注目し、当該血管内皮細胞増殖因子／血管透過性因子が腫瘍血管新生になんらかの係わりが有るのではないかと仮説をたてて研究を行い、その結果血管内皮細胞増殖因子／血管透過性因子の作用は腫瘍細胞そのものに対してではなく血管内皮細胞に特異的に発揮され、生体内では血管の新生を促すことを見出し、この血管内皮細胞増殖因子／血管透過性因子の作用を抑制することによって腫瘍の増殖を抑えるのみでなく、腫瘍の転移を抑制することが出来ることを見だし本発明を完成したのである。

【0008】すなわち、本発明は、血管内皮細胞増殖因子阻害剤からなる腫瘍転移抑制剤に関するものであり、当該血管内皮細胞増殖因子阻害剤が抗血管内皮細胞増殖因子抗体である腫瘍転移抑制剤に関するものであり、さらには当該抗血管内皮細胞増殖因子抗体が抗血管内皮細胞増殖因子／血管透過性因子抗体である腫瘍転移抑制剤に関するものであり、特に血管内皮細胞増殖因子／血管透過性因子のアミノ酸配列の一部である下記配列と反応する抗血管内皮細胞増殖因子／血管透過性因子抗体からなる腫瘍転移抑制剤に関するものである。

1. KPSCVPLMR

2. SFLQHNKCECRP

3. KCECRPKKDRAR

【0009】

【実施の形態】本発明の腫瘍転移抑制剤は、血管内皮細胞増殖因子の機能を阻害するものであれば、如何なる形態のものでもよく、最も一般的には、請求項2に記載した様な血管内皮増殖因子に作用する抗体、もしくはその

一部分が挙げられるが、本発明の腫瘍抑制剤はそれらに限定されることなく、例えば、血管内皮細胞増殖因子の作用を阻害する不活性な血管内皮細胞増殖因子、または

その一部分、血管内皮細胞増殖因子の受容体の機能を損なう、例えば、血管内皮細胞増殖因子受容体に対する抗体、または抗体の一部分、さらには、血管内皮細胞増殖因子の産生そのものを抑制する薬剤等を挙げることができる。特に本発明においては、血管内皮細胞増殖因子阻害剤としては、抗血管内皮細胞増殖因子抗体、さらには抗血管内皮細胞増殖因子／血管透過性因子抗体が挙げられ、特に特定のエピトープを有する抗血管内皮細胞増殖因子／血管透過性因子抗体が好ましいものとして挙げられる。

【0010】本発明によれば、血管内皮細胞増殖因子の作用を抑え、腫瘍に栄養や酸素を供給する経路である腫瘍血管の腫瘍への遊走を阻止し、腫瘍の増殖を抑制すると共に腫瘍の転移を抑制するという作用が示されるのである。さらに本発明の腫瘍転移抑制剤は、既知の抗癌剤と併用されると、両者の標的が異なる、すなわち抗癌剤の標的は増殖腫瘍細胞であるのに対し、血管内皮細胞増殖因子阻害剤はその名の通り、血管内皮細胞という均一な細胞を標的とするものであり作用機序が異なるため、腫瘍の増殖を抑えたとともにさらに有効に腫瘍の転移を抑制するという作用が示される。

【0011】以下本発明を詳細に説明する。

(1) 抗血管内皮細胞増殖因子ポリクローナル抗体の作製

単離した血管内皮細胞増殖因子のc DNAを大腸菌の中でグルタチオンS トランスフェラーゼとの融合蛋白として発現させ、得られた蛋白を抗原として常法に従うさ30ぎを免疫した。抗体価の上昇した血清からDEAEのクロマトグラフィーでIgGを分画した。得られた抗体が血管内皮細胞増殖因子と反応することを確認するために、血管内皮細胞増殖因子を12%SDS-PAGEで展開し、ゲルからナイロン膜に蛋白を移し、免疫して得られた抗体を反応させWestern blotを行い、血管内皮細胞増殖因子の分子量に相当する位置における特異的な交差反応により、作成した抗体が血管内皮細胞増殖因子を認識することを確認した。

【0012】(2) 抗血管内皮細胞増殖因子モノクローナル抗体の製造

抗血管内皮細胞増殖因子モノクローナル抗体は動物を血管内皮細胞増殖因子で免疫し、その脾細胞を取り出しこれをミエローマ細胞と融合して得たハイブリドーマ細胞を培養することにより製造することができる。このハイブリドーマの製造は例えばKohlerとMilsteinの方法[Nature, 256:495(1975)]等により行うことができる。

抗体産生細胞の調製

免疫用動物にはマウス、ラット、ウサギ等の齧歯類が用いられる。ミエローマ細胞としてはマウスまたはラット

由来の細胞が用いられる。そして免疫動物1匹に対して血管内皮細胞増殖因子10~100μgの量を抗原として2~3週間ごとに最低2~3回免疫を行う。動物の飼育及び脾細胞の採取は常法に従って行われる。尚、免疫の際には抗原に例えばグルタチオン-S-トランスフェラーゼ等を融合させて得られた蛋白質又はキーホールリンペットヘモシアニン等を結合させて得られた複合蛋白質を抗原として用いることもできる。

ミエローマ細胞の調製

10 ミエローマ細胞としてはマウスミエローマSp2/O-Ag14(Sp2)、P3/NS1/1-Ag4-1(NS-1)、P3×63Ag8U.1等が挙げられる。これらの細胞の継代培養は常法に従って行われる。

細胞融合

脾細胞とミエローマ細胞とを1:1~1:10の割合で混合してポリエチレングリコールと混合するか電気パルス処理することにより細胞融合を行うことができる。

ハイブリドーマの選択

融合細胞(ハイブリドーマ)の選択はヒポキサンチン($10^{-3} \sim 10^{-5} M$)、アミノプテリン($10^{-6} \sim 10^{-7} M$)、チミジン($10^{-5} \sim 10^{-6} M$)を含む培地を用いて培養して生育してくる細胞をハイブリドーマとすることにより行われる。

ハイブリドーマの培養

ハイブリドーマのクローン化は限界希釈法により少なくとも2回繰り返して行う。ハイブリドーマを通常の動物細胞と同様にして培養すれば培地中に本発明のモノクローナル抗体が産生される。又、ハイブリドーマ細胞をマウス腹腔内に移植して増殖することにより腹水中に本発明のモノクローナル抗体を蓄積させることもできる。

モノクローナル抗体の採取及び精製

30 ハイブリドーマ細胞の培養液中又は腹水中に蓄積したモノクローナル抗体は従来から用いられている硫酸分画法、PEG分画法、イオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーを用いる方法で精製される。又、プロテインAやプロテインG等のアフィニティークロマトグラフィーによる方法も利用できる。モノクローナル抗体の選別には酵素免疫測定法、ウェスタンブロットティング法等が用いられる。又、モノクローナル抗体のアイソタイプの設定はモノクローナル抗体の酵素免疫測定法又はオクタブロニー法等によって行うことができる。

【0013】(3) モノクローナル抗体の反応部位の同定

血管内皮細胞増殖因子のアミノ酸配列の一部分に相当するペプチドの作製

血管内皮細胞増殖因子における連続した12個のアミノ酸を1つのペプチドとして血管内皮細胞増殖因子の全配列を網羅する複数のペプチドを設計する。設計された各ペプチドは例えばマルチピンペプチド合成法[Maeji, N.

J. et al., J. Immunol. Method, 134: 23 (1990)]等により合成することができる。尚、合成したペプチドの定量はオルトフタルアルデヒドを用いてアミノ基を定量する事により行うことができる。

モノクローナル抗体と反応するペプチドの同定

以上のようにして合成した複数のペプチドは血管内皮細胞増殖因子の全領域に対応するものである。従ってそれら複数の全てのペプチドとモノクローナル抗体の反応性を調べることにによりモノクローナル抗体が血管内皮細胞増殖因子のどの部位に反応しているかを明らかにすることができる。反応性の測定には酵素免疫測定法、オクトロニー法、ウエスタンブロッティング法等が用いられる。

【0014】(4)モノクローナル抗体の腫瘍転移抑制剤としての使用

本発明においてモノクローナル抗体又はキメラ抗体又はヒト化抗体を腫瘍転移抑制剤として投与する場合には投与する対象を特に限定しない。例えば個々の腫瘍の転移を抑制することを特異目的として用いることができる。又投与する方法は経口又は非経口でもよく経口投与には舌下投与を包含する。非経口投与には注射例えば皮下、筋肉、血管内注射、点滴、座剤等を含む。又、その投与量は動物か人間かによって、又年齢、投与経路、投与回数により異なり、広範囲に変えることができる。この場合モノクローナル抗体の有効量と適切な希釈剤および薬学的に使用し得る担体の組成物として投与される有効量は0.1~100mg/kg体重/日であり1日1回から数回に分けて毎日又は数日に1回又は1~2週間に1回投与される。本発明においてモノクローナル抗体を経口投与する場合はそれに適用される錠剤・顆粒剤・細粒剤・散剤・カプセル剤等は通常それらの組成物中に製剤上一般に使用される結合剤・包含剤・賦形剤・滑沢剤・崩壊剤・湿潤剤のような添加剤を含有する。又、経口用液体製剤としては内用水剤・懸濁剤・乳剤・シロップ剤等いずれの状態であってもよく、又、使用する際に再溶解させる乾燥生成物であっても良い。更にその組成物は添加剤・保存剤の何れを含有しても良い。また非経口投与の場合には安定剤・緩衝剤・保存剤・膨張化剤等の添加剤を含有し通常単位投与量アンブル若しくは多投与量容器又はチューブの状態を提供される。上記の組成物は使用する際に適当な担体たとえば発熱物質不含の滅菌された溶解剤で再溶解させる粉体であっても良い。本発明の腫瘍転移抑制剤は既知の抗癌剤と併用して用いることができ、併用される抗癌剤として格別に限定されるものはないが、具体的に例示すれば、マイトマイシン、シスプラチン、シクロホスアミド、ビンクリスチン等を挙げることができる。それら抗癌剤を併用する際は、それら抗癌剤で指示に従えばよく、また減量することも可能である。

【0015】

【実施例】以下実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し本発明はこれら実施例に限定されるものではない

(1)血管内皮細胞増殖因子/血管透過性因子モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製

単離したヒト血管内皮細胞増殖因子/血管透過性因子(以下VEGFという)のcDNAにて形質転換した酵母の培養液よりヒトVEGFを精製し(特開平7-31496号参照)、キーホールリンベットヘモシアニン(KLH)とグルタルアルデヒドを用いて複合体を作製し、得られた蛋白を抗原として常法に従ってマウスモノクローナル抗体を作製した。即ち、KLH-VEGFで免疫したマウスの脾細胞とマウスミエローマ細胞(Sp2)をポリエチレングリコール存在下で細胞融合させた。得られたハイブリドーマは限界希釈法によりクローニングした。VEGFとクローン化したハイブリドーマの培養上清の反応性を酵素免疫測定法により調べ、VEGFと反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択した。又、このハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体をMV833と命名した。なお得られたモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-15192として寄託されている。

【0016】(2)VEGFモノクローナル抗体の調製
選択したハイブリドーマをヌードマウスの腹腔内に移植し、モノクローナル抗体を大量に含む腹水を採取した。この腹水中からプロテインGアフィニティカラム(MAbTrapGII、ファルマシア社製)を用いてモノクローナル抗体を精製した。又、抗体のクラスを抗マウス免疫グロブリンサブクラス特異的抗体を用いた酵素免疫測定法により調べた結果、MV833抗体のクラスはIgG1であった。又、下記の方法で測定したVEGF₁₂₁及びVEGF₁₆₅に対する解離定数は以下の通りであり本発明のモノクローナル抗体はVEGFに対して強い親和性を有することがわかる。

○ $5.70 \times 10^{-11} \text{ M} \pm 0.35 \times 10^{-11} \text{ M}$ (VEGF₁₂₁)

○ $1.10 \times 10^{-10} \text{ M} \pm 0.11 \times 10^{-10} \text{ M}$ (VEGF₁₆₅)

40 解離定数の測定方法

モノクローナル抗体を0.1M塩化ナトリウムを含む25mM炭酸緩衝液(pH=9.0)で2μg/mlに調製し取り外し可能な有穴プレートに100μlずつ添加し4℃で一晩放置する。次に穴から溶液を除き1%BSA-PBSを30μlずつ添加し37℃で4時間放置する。1%BSA-PBSを取り除いた後0.1%BSA-PBSで調製したVEGFと¹²⁵I標識VEGF(¹²⁵I標識VEGF₁₂₁はVEGF₁₂₁をクロラミンT法により標識、¹²⁵I標識VEGF₁₆₅はアマシャム社より購入)反応混液を穴あたり200μl添加して一晩放置する。この反応混

液中のVEGF濃度はVEGF₁₂₁が0~1ng/穴、VEGF₁₆₅が0~10ng/穴、¹²⁵I標識VEGFが1×10⁴cpm/穴(¹²⁵I標識VEGF₁₂₁; 66.7pg/穴、¹²⁵I標識VEGF₁₆₅; 116pg/穴)とする。穴から反応混液を取り除き0.1%BSA-PBSで6回洗浄した後、穴を1個ずつ切り離して分析用チューブに入れガンマカウンターにてカウントしその結果より作成した散布図から解離定数を求める。又、下記の方法で測定した本発明のモノクローナル抗体の等電点はpI=5.2~5.5であった。現時点で報告のある他のIgG1タイプの抗VEGFモノクローナル抗体の等電点は我々の報告しているMV101がpI=7.0~7.5でありジェネンテック社のA4.6.1がpI=4.2~5.2(Kim, K.J. et.al. Growth Factors, 7:53(1992))であり本発明の物質はいずれの物質とも異なる物質である。

等電点の測定方法

モノクローナル抗体の等電点電気泳動は市販の等電点電気泳動用アガロースゲル(和科盛社)を使用し同社の等電点電気泳動層にて泳動した。泳動は等電力出力可能なパワーサブライ(バイオラド社)により3Wで30分間泳動した。泳動後ゲルは銀染色キット(バイオラド社)にて蛋白染色した。モノクローナル抗体の等電点は同時に泳動した等電点マーカー蛋白の泳動度より抗体の等電点を求めた。

【0017】(3) VEGF中のモノクローナル抗体の

反応部位の同定

(a) VEGFのアミノ酸配列の一部分に相当するペプチドの作製

ヒトVEGF₁₂₁のアミノ配列の連続した12個のアミノ酸を1つのペプチドとして全配列を網羅する67種のペプチドを考案し、各ペプチドをマルチピンペプチド合成法(Maeji, N.J. et.al. J. Immunol. method, 134:23(1990))により合成した。まず96穴アッセイプレート用ピンブロックのピンの先端に導入された9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)-β-アラニンからピペリジンによりFmoc基を除去した後、ジシクロヘキシカルボジイミドとヒドロキシベンゾトリアゾール存在下でFmoc-アミノ酸を縮合させた。N,N-ジメチルホルムアミドで洗浄後、再びジシクロヘキシカルボジイミドとヒドロキシベンゾトリアゾール存在下でFmoc-アミノ酸を縮合させ、この操作を繰り返すことにより目的のペプチドを合成した。縮合反応終了後、無水酢酸でアセチル化を行い、さらにトリフルオロ酢酸で側鎖保護基を除去した。ピン上で合成したペプチドはピンを中性溶液中に浸すことにより切り出した。合成したペプチドの定量はオルトフタルアルデヒドを用いてアミノ基を定量することにより行った。合成した67種のペプチドのアミノ酸配列を表1に示した。数字はペプチド識別番号を示す。

【0018】

【表1】

1. AFMAEGGGQNH	24. QETPDRIEYIFK	47. VPTRESNITMQI
2. MAEGGGQNHHEV	25. EYTPDRIEYIFKP	48. TRESNITMQIMR
3. EGGGQNHHEVVK	26. YPDRIEYIFKPS	49. RESNITMQIMRIK
4. GGGQNHHEVVKFM	27. PDRIEYIFKPS	50. NITMQIMRIKPH
5. QNHHEVVKFMDV	28. DRIEYIFKPSCV	51. TMQIMRIKPHQG
6. HHEVVKFMDVTQ	29. RIEYIFKPSVCP	52. QIMRIKPHQGGH
7. EVVKFMDVTQRS	30. IRYIFKPSCVPL	53. MRIKPHQGGHIG
8. VKFMDVTQRSYC	31. YIFKPSCVPLMR	54. IKPHQGGHIGEM
9. FMDVTQRSYCHP	32. FKPSCVPLMRCC	55. PHQGGHIGEMSF
10. MDVTQRSYCHPI	33. KPSCVPLMRCCG	56. QGGHIGEMSFQ
11. DVTQRSYCHPIE	34. SCVPLMRCCGCC	57. QHIGEMSFQHN
12. VTQRSYCHPIET	35. CVPLMRCCGCCN	58. IGEMSFQHNKC
13. YORSYCHPIETL	36. VPLMRCCGCCND	59. EMSFLQHNKCEC
14. QRSYCHPIETLV	37. LMRCCGCCNDEG	60. SFLQHNKCECRP
15. RSYCHPIETLVD	38. MRCGCCNDEGL	61. LQHNKCECRPKK
16. SYCHPIETLVDI	39. RCGCCNDEGLE	62. ENKCECRPKKDR
17. YCHPIETLVDIF	40. CGCCNDEGLEC	63. KCECRPKKDRAR
18. HPITLVDIFQRE	41. GCCNDEGLECVP	64. ECRPKKDRARQE
19. IRTLVDIFQETP	42. CNDEGLECVPTE	65. EPKKDRARQEC
20. TLVDIFQETPDE	43. DEGLECVPTEES	66. KDRARQECDEP
21. VDFQETPDEIE	44. GLECVPTESNI	67. DRARQECDEKPR
22. IFQETPDRIEYI	45. ECVPTRESNITM	
23. FQETPDRIEYIF	46. CVPTRESNITMQ	

【0019】(b) MV833抗体と反応するペプチドの
同定

以上のようにして合成した67種のペプチドはヒトVEGF₁₂₁の全領域に対応するものである。したがって67種のペプチドとMV833抗体との反応性を調べることにによりMV833抗体がVEGFのどの部位に反応しているかを明らかにすることができる。そこで酵素免疫測定法により67種のペプチドとMV833抗体との反応性を調べた。96穴NOSプレート(コースター社製)に67種の20μMペプチド溶液を入れ室温で2時間放置した。0.1%BSA-PBSでプレートの穴を3回洗浄した後、2%BSA-PBSを入れ室温で1時間放置した。2%BSA-PBSを除いた後、MV833(1%BSA-PBS溶液)を入れ室温で1時間放置した。0.1%BSA-PBSで6回洗浄後ペルオキシダーゼ標識したヒツジ抗マウスIgG(アマシャム社)(0.1%BSA-PBS溶液)を入れ室温で1時間放置した。0.1%BSA-PBSで6回洗浄後8.3mg/mlオルトフェニレンジアミン2塩酸塩および0.01%過酸化水素を含む0.2Mトリス-クエン酸緩衝液(pH=5.2)を入れて発色させた。反応は2規定硫酸を加えて停止させた後、吸光度(OD490/650)を測定した。以上の方法で測定した結果をグラフにプロットし図1に示した。

【0020】MV833抗体は67種類のペプチドの中で

*ペプチド識別番号31、32、33、60、63の5つのペプチドに強く反応した。ペプチド識別番号31~33のペプチドにはKPSCVPLMRという配列が共通に含まれていることより、この領域ではMV833抗体はKPSCVPLMRというアミノ酸配列部分と反応していると考えられる。したがって、MV833抗体はVEGFのKPSCVPLMR配列とSFLQHNKCECRP配列とKCECRPKKDRAR配列とに反応していることが予想される。抗体はタンパク質の表面に露出している部分を認識すると考えられるため、この2種類のアミノ酸配列部分はVEGFの表面に露出している部分であると言える。又、モノクローナル抗体は抗原決定基が単一であると言われているが、高次構造をとっている蛋白質などの高分子物質が抗原の場合は抗体が立体的に抗原を認識し、蛋白質の一次構造レベルで抗体の反応性を調べた時に二箇所以上の不連続なアミノ酸配列に反応することがある。MV833抗体がVEGF中の二箇所のアミノ酸配列部分に反応したことより、本抗体は二箇所のアミノ酸配列部分を立体的に同時に認識していると考えられる。

【0021】微量タンパク質やウイルスの研究を行う場合現在ではその遺伝子のクローニングを行い、その塩基配列よりタンパク質のアミノ酸配列が予想できる。このアミノ酸配列をもとにして親水性の高い部位を探索し、

11

その部位の合成ペプチドに対するポリクローナル抗体やモノクローナル抗体を作製して免疫学的解析に用いている。親水性の高い部位の探索にはHoop&Woodsらの方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3824(1981)]などを用いて解析しているが、あらゆるタンパク質にあてはまるとは限らない。したがって本発明によりVEGFの表面に露出している部位の中で腫瘍増殖に重要である部分が明らかにされたことにより強い抗腫瘍活性を有したVEGF抗体を容易に作製できるようになり、また、本発明に採用された方法は蛋白質の表面に露出している部位を明らかにする方法としても適用されるものである。

【0022】(4) VEGFモノクローナル抗体の抗腫瘍・転移抑制試験-1

ヒト大腸癌細胞株TK-4の小腫瘍片5mmを5週令のヌードマウスの雄(Balb/c-nu/nu nude mice)の盲腸漿膜壁に直接縫着した。腫瘍移植1日目よりモノクローナル抗体を100μg/0.2ml/マウスを1回/4日の投与量で投与した群(VEGF-1D: n=12)と移植10日目よりモノクローナル抗体を腹腔内に投与した群(VEGF-10D: n=6)の42日目における腫瘍増殖及び肝転移抑制効果を観察した。尚、比較コントロール群*

12

*としては、生理食塩水又はマウスIgGを腫瘍移植1日目より投与した群(それぞれNSS/Cont-IgG: n=12)を用いた。各群における原発腫瘍重量、肉眼的肝転移巣数及びマウス体重は、図2、図3及び図4に示されるとおりであり、ヒト大腸癌における腫瘍増殖及び肝転移抑制効果が示され、体重減少などの副作用は認められず、該抗体は抗腫瘍及び転移療法に有効なものであることが示された。

10 (5) VEGFモノクローナル抗体の抗腫瘍・転移抑制試験-2

ヒト大腸癌細胞株TK-13を用い、腫瘍移植10日目よりモノクローナル抗体を100μg/0.2ml/マウスを1回/2日の投与量で腹腔内投与した群と比較コントロール群としては、生理食塩水を投与した群について上記と同様に試験を行い、移植後42日目に評価した。各群における原発腫瘍重量、肉眼的肝転移巣数及びマウス体重は表2のとおりであり、ヒト大腸癌細胞株TK-13についても腫瘍増殖及び肝転移抑制効果が有意に認められた。

【0023】

【表2】

	原発腫瘍重量(g)	肉眼的肝転移巣数	マウス体重(g)
抗体投与群	0.28±0.11***	3.85±10.38	24.39±1.50**
コントロール群	1.92±0.51	26.36±37.92	22.87±1.61

注: * = p < 0.05、** = p < 0.01、*** = p < 0.001

【0024】(6) VEGFモノクローナル抗体・抗癌剤併用の抗腫瘍・転移抑制試験

ヒト胃癌細胞株MT-2を用い、5週令のヌードマウスの雄(Balb/c-nu/nu nude mice)の胃壁に直接縫着し、1)コントロール群、2)モノクローナル抗体単独投与群、3)マイトマイシンC単独投与群、4)モノクローナル抗体・マイトマイシンC併用投与群に分けた。マイトマイシンCを投与する2群、すなわち、マイトマイシンC単独投与群と併用投与群にはマイトマイシンCを腫瘍移植10日から7日目毎に2mg/kgを計3回腹腔内投与し、コントロール群には生食を同容量投与した。またモノクローナル抗体を投与する2群、すなわち、モノクローナル抗体単独投与群と併用投与群にはモノクローナル抗体を移植12日から100μg/マウスを週2回ずつ計8回腹腔内投与し、コントロール群にはマウスIgG ※

※を同量投与し、移植6日目に評価を行った。各群における原発腫瘍重量、肝転移匹数、マウス体重及び脾重量は図5、図6、図7及び図8に示されるとおりであり、原発腫瘍重量及び肝転移個数について解析した結果を表3に示した。これらの結果から、ヒト胃癌における原発腫瘍重量に関しては、モノクローナル抗体、マイトマイシンC単独投与群及び併用投与群において有意に抑制効果が認められ、肝転移においても、特に併用投与群において顕著に抑制効果が示された。体重減少などの副作用はマイトマイシンCを投与した2群では認められたが、モノクローナル抗体投与群では認められず、該抗体が抗腫瘍及び転移療法に有効なものであることがこの結果からも示された。

【0025】

【表3】

13

14

	原発腫瘍重量(g)	肝転移匹数	肝転移個数
コントロール群	0.99±0.44	9/16(57.5%)	2.88±3.24
マイトマイシン投与群	0.02±0.06***	4/16(25.0%)	0.31±0.60**
抗体投与群	0.54±0.26***	3/14(21.4%)	0.57±1.22*
併用投与群	0.01±0.03***	0/16(0%)***	0**

注：* = $p < 0.05$ 、** = $p < 0.01$ 、*** = $p < 0.001$

【0026】

【発明の効果】本発明により腫瘍の転移が抑制され、本発明の薬剤は転移療法に有効に利用されるものである。

【0027】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直線状

配列の種類：タンパク質

起源：

セルライン：

配列：

Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg

1

5

10

配列番号：2

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直線状

配列の種類：タンパク質

起源：

セルライン：

配列：

Ser Phe Leu Glu His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro

1

5

10

配列番号：3

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

10*トポロジー：直線状

配列の種類：タンパク質

起源：

セルライン：

配列：

Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg

1

5

10

【図面の簡単な説明】

【図1】 ヒトVEGF₁₂₁中の一部分に相当する67種のペプチドに対するモノクローナル抗体MV833の反応性を調べた図である。

20 【図2】 VEGFモノクローナル抗体を投与した際の原発腫瘍重量を示す図である。

【図3】 VEGFモノクローナル抗体を投与した際の肉眼的肝転移巣数を示す図である。

【図4】 VEGFモノクローナル抗体を投与した際のマウス体重を示す図である。

【図5】 VEGFモノクローナル抗体とマイトマイシンCを併用投与した際の原発腫瘍重量を示す図である。

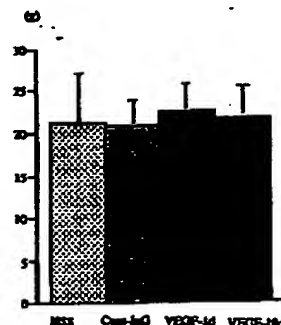
【図6】 VEGFモノクローナル抗体とマイトマイシンCを投与した際の肝転移匹数を示す図である。

30 【図7】 VEGFモノクローナル抗体とマイトマイシンCを投与した際のマウス体重を示す図である。

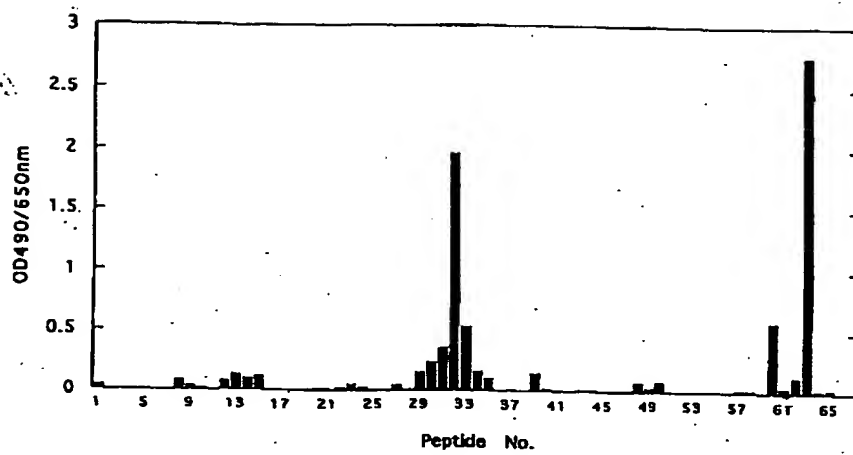
【図8】 VEGFモノクローナル抗体とマイトマイシンCを投与した際の脾重量を示す図である。

*

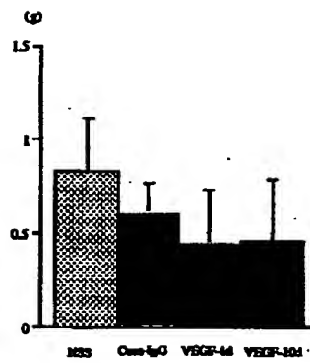
【図4】



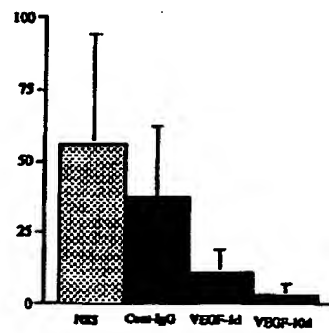
【図1】



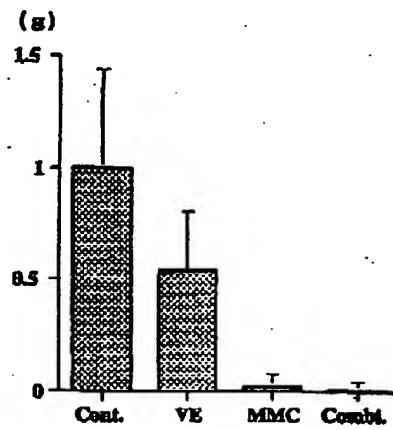
【図2】



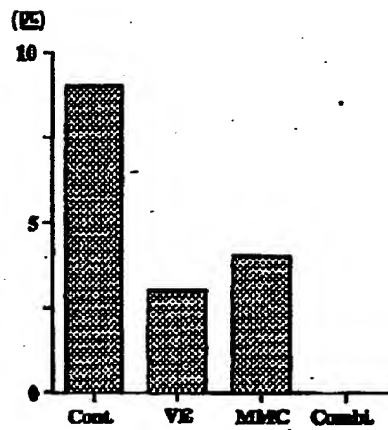
【図3】



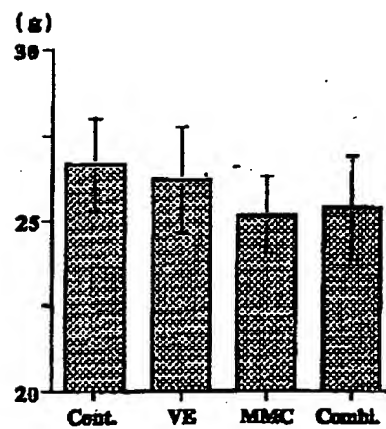
【図5】



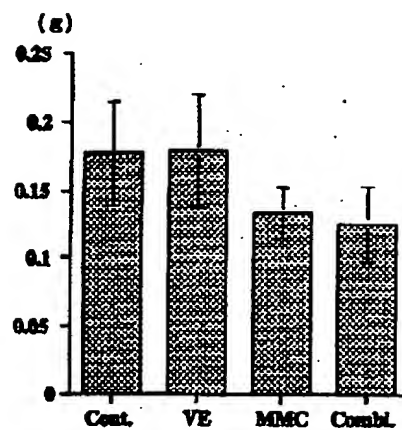
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

識別記号

F I

C 0 7 K 7/08

C 0 7 K 14/47

14/47

C 1 2 P 21/08

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 15/00

C

(72)発明者 馬場 正三

静岡県浜松市半田町3776 医大宿舎F-22A

(72)発明者 浅野 誠

茨城県つくば市大久保2番 東亜合成株式会社つくば研究所内

(72)発明者 鈴木 日出夫

茨城県つくば市大久保2番 東亜合成株式会社つくば研究所内